

氏 名	司馬 真央
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第806号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	遺伝子情報を応用した生薬鑑別
論文審査委員(主査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(自然科学研究科・教授), 御影 雅幸(自然科学研究科・教授), 太田 富久(自然科学研究科・教授), 横川 弘一(医学部附属病院・助教授)

【Abstract】

Identification of crude drugs has been carried out based on their morphological characteristics or their chemical constituents usually. However, these phenotypic traits vary depending on environmental factors such as the developmental stage of the original plants, seasons of harvest and geographic origins of the crude drugs, and also intra-specific variation, which sometimes makes identification of the crude drugs based on their morphological and chemical characteristics, is quite difficult.

Molecular phylogenetic studies have been carried out energetically from the 1980's. In these studies, the sequences of *rbcL* and *matK* gene on chloroplast DNA (cpDNA), and Internal Transcribed Spacer (ITS) on nuclear ribosomal DNA (nrDNA) have been reported. It is expected that the genetic identification of crude drugs is possible on the basis of their molecular phylogenetic studies and sequence data.

In this study, I presented two examples of the identification of crude drugs based on genetic information and discussed about the availability and problems of the identification of crude drugs based on genetic information. The one is discrimination of Maidong derived from *Ophiopogon* and *Liriope* species by *rbcL* sequences, and their chemical components and tuber anatomy. As a result, it was possible to discriminate clearly by the *rbcL* genotype between the Maidong derived from *Ophiopogon* and *Liriope* species. And another one is identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA. On the results, it was suggested that ITS sequences of nrDNA would be useful for the identification of the crude drugs derived from the four species of *Atractylodes* (the botanical origins of Byakujutsu and Sohjutsu) and their interspecific hybridizations.

Several new insights were obtained from the studies and these were described for details in the thesis for a doctorate.

【緒言】

生薬とは動植物などの天然の素材を原料とし、多くの場合は薬用植物の一部であり、その品質は多くの要因で変化するため、品質評価は必要不可欠となる。生薬の品質評価法として、第一にすべきことが生薬の鑑別である。正しい基原の生薬を使用しなければ、生薬を原料として使用する漢方薬等の伝統薬の薬効や安全性は保証できない。また、生薬について研究する場合においても、研究対象の生薬は正しいものではないと、その後の試験結果はすべて間違ったデータになってしまう。生薬の鑑別は、生薬を使用する医療における根源的な重要なことである。

生薬の基原種鑑別は従来形態学的特徴や化学成分を指標として行われてきた。しかし、特に近縁種および雑種基原の生薬において、生薬の形態学および成分的特徴は非常に類似し、これらの特徴を指標とした鑑別では限界があり、より客観的な新たな鑑別方法が求められている。

1980年代から生物の分子系統学的研究の発展とともに、植物の遺伝子研究の成果が蓄積され始め、これらのデータを基礎として種のまとまりを示す遺伝子多型を明確にすることで、生薬のDNA鑑別が可能ではないかと考えられてきた。生薬の遺伝子鑑別をするのに、植物の種のまとまりを正確に把握した研究が必要であり、遺伝子多型の状況は植物によって異なるので、鑑別対象とする生薬ごとに適切な遺伝子や遺伝子間領域を選定、調査し、そして検証する必要がある。

そこで、第2章において別属に由来する生薬の鑑別には、*rbcL* 遺伝子のような分子進化速度の遅い遺伝子が適していると考え、*Ophiopogon* 属と *Liriope* 属に由来するものがある麦門冬の葉緑体 DNA、*rbcL* 遺伝子の塩基配列に基づく鑑別について検討した。さらに DNA 鑑別した市場品麦門冬について、内部形態を観察し、油滴、根被、柱状晶について調査した。また、ホモイソフラボノイドについて定量分析を行い、内部形態の調査結果とともに DNA 鑑別結果と比較し、これらの形態学および成分的特徴による鑑別精度に関しても言及した。

また、葉緑体 DNA は一般的に片親由来とされているので、雑種の検出には適さないと考えられる。生薬には雑種の可能性が示唆されて、鑑別が困難な場合、これらの鑑別には両親由来の核 DNA に由来するマーカーでの鑑別が適していると考えられた。そこで、第3章では、*ユリ科*の *Atractylodes* 属植物の根茎は、蒼朮と白朮として使用されているが、これら *ユリ科*生薬の基原種鑑別は困難であり、その原因のひとつは雑種があるかもしれないとの報告もある。本研究では、地上部が確認できる *Atractylodes* 属植物の押葉標本 252 点について、両親由来の *nrDNA*、ITS 領域の塩基配列を調査し、*ユリ科*生薬の基原種鑑別、さらには雑種の検出が可能か検討した。また形態学および成分的特徴の違いについても検証した。その上、基原的に疑問が残っていた中国東北産の白朮と日本産の佐渡蒼朮の基原について言及した。

さらに、遺伝子情報を応用した生薬鑑別における有用性および問題点について総合的に考察を加えた。

本研究の内容および結果は主に以下の通りである。

【1】葉緑体 DNA、*rbcL* 遺伝子の塩基配列に基づく麦門冬の基原種鑑別について

1. 麦門冬には *ユリ科*の *Ophiopogon* 属由来と *Liriope* 属由来のもの、2 種類があることが知られている。生薬の形態学的特徴からは正確な基原種鑑別が困難なことから、遺伝子情報による基原種鑑別の可能性について検討した。まず、地上部形態から種が同定された *Ophiopogon* 属植物(6 種 62 サンプル)、*Liriope* 属植物(3 種 1 変種 22 サンプル)について、葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子の塩基配列を調査した。この結果、得られた塩基配列は 6 種類のジェノタイプに分類された。このジェノタイプの違いにより、*Ophiopogon* 属と *Liriope* 属は明確に鑑別可能であることが示唆された。
2. ただし、*rbcL* 遺伝子の塩基配列から得られたジェノタイプでは、*Ophiopogon* 属内または *Liriope* 属内の正確な種の同定はできなかった。これは *rbcL* 遺伝子の塩基配列において、種間の鑑別に有効な塩基置換等の遺伝的変異が認められなかったためであり、*Ophiopogon* 属内および *Liriope* 属内の正確な種を鑑別するには、*rbcL* 遺伝子よりも進化速度が速いと報告されている葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子や遺伝子間領域、あるいは *nrDNA* の ITS 領域等の調査が必要と考えられる。
3. 葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子の塩基配列から、市場流通品麦門冬 44 サンプルの基原を鑑別した。その結果、29 サンプルは *Ophiopogon* 属由来と同定され、15 サンプルは *Liriope* 属由来と同定された。*Ophiopogon* 属由来と同定された市場品麦門冬は全て中国産であった。一方、*Liriope* 属由来と同定された市場品麦門冬は、従来、*Liriope* 産を使用しているといわれていた韓国産だけではなく、中国産にも *Liriope* 属由来の麦門冬が含まれていた。
4. これまで、*Ophiopogon* 属由来の麦門冬には *Methylophiopogonane A* と *Methylophiopogonane B* が含むが、*Liriope* 属由来の麦門冬は同成分を含まないと報告されている。これらの成分による基原種鑑別の精度を確認するために、*rbcL* 遺伝子の塩基配列から基原種を同定したサンプルにおけるこれらの成分の有無を検証した。この結果、*rbcL* 遺伝子の塩基配列から *Ophiopogon* 属由来と同定された麦門冬は全てのサンプルにおいて上記2成分が検出されたが、*Liriope* 属由来と同定された麦門冬は全てのサンプルにおいて同成分は検出されなかった。このことから、*Methylophiopogonane A* と *Methylophiopogonane B*、これら2成分の有無も麦門冬が *Ophiopogon* 属由来か *Liriope* 属由来かの鑑別における指標として有効であることを確認した。
5. 同様に麦門冬の内部形態学的特徴(油滴、根被、柱状晶)の有無から *Ophiopogon* 属由来か *Liriope* 属由来か鑑別可能との報告がある。これらの内部形態学的特徴の有無による鑑別方法の精度を確認するために、*rbcL* 遺伝子の塩基配列から基原種を同定したサンプルにおけるこれらの形態学的特徴の有無の関係について検証した。この結果、*rbcL* 遺伝子の塩基配列から *Ophiopogon* 属由来と同定された麦門冬 29 サンプル中、油滴、根被、柱状晶の全てが認められた麦門冬は 18 サンプルであり、つまり油滴、根被、柱状晶の全ての含有を *Ophiopogon* 属に由来することの指標にすると、その

鑑別精度は 62%(18/29 サンプル)となる。また同様に、*Liriope* 属由来と同定された麦門冬 15 サンプル中、油滴、根被、柱状晶の全てが認められない麦門冬は 10 サンプルであり、つまり油滴、根被、柱状晶の全てを含有しないことを *Liriope* 属に由来することの指標とすると、その鑑別精度は 67%(10/15 サンプル)となることが判明した。

- ただし、麦門冬の内部形態学的特徴を再検討すると、鑑別精度を低下させているのは柱状晶を鑑別指標としたことであった。鑑別の指標として柱状晶の有無を外して、油滴と根被の含有を *Ophiopogon* 属に由来することの指標にすると、その鑑別精度は 76%(22/29 サンプル)となる。また同様に、油滴と根被を含有しないことを *Liriope* 属に由来することの指標とすると、その鑑別精度は 93%(14/15 サンプル)に向上する。
- このように、遺伝子情報による基原種鑑別を実施した後、これらについて他の鑑別方法と比較することにより、その鑑別方法の精度の検証が可能である。また、さらに鑑別の指標を見直すことで鑑別精度の向上が可能となることが示唆された。

【Ⅱ】核リボソーム DNA, ITS 領域の塩基配列に基づく朮類生薬の基原種鑑別について

- 朮類生薬は、白朮として *Atractylodes japonica*, *A. macrocephala*(=*A. ovata*)の根茎が使用され、蒼朮としては *A. lancea*, *A. chinensis* の根茎が使用されている。ただし、*A. japonica* は中国では関蒼朮の名称で蒼朮の一種類として流通することもあり、蒼朮中に白朮の基原種である *A. japonica* 由来の生薬が混入する可能性は否定できない。そこで本研究にて、nrDNA, ITS 領域の塩基配列から白朮と蒼朮の基原種の正確な鑑別方法を確立した。
- 次に ITS 領域の塩基配列より鑑別された基原種ごとに白朮の特有と考えられている *Atractylon* の有無を調査したところ、白朮の基原種のみではなく、検出頻度、含量は白朮よりも低いが蒼朮の基原種からも検出頻度 40%程度にて *Atractylon* を検出した。つまり、*Atractylon* の含有を白朮の指標として設定された現状の日本薬局方のビャクジツの確認試験とソウジツの純度試験では、その目的を十分に果たせないことが予測された。したがって、これら確認試験、純度試験では本研究で示されたような遺伝子情報を応用した鑑別法を採用して、より正確な生薬基原種の使用を推進すべきと考える。
- ITS 領域の塩基配列から基原種を同定された *A. japonica*, *A. macrocephala*, *A. lancea*, *A. chinensis* および *A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種の根茎の 3 次元 HPLC パターンを比較すると、蒼朮の基原種である *A. lancea*, *A. chinensis* および *A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種の根茎の 3 次元 HPLC パターンは類似しており、これらを蒼朮という一種類の生薬として使用していることは理解できた。ただし、細かな成分では *A. chinensis* では 3-Isovaleroyl-4,6,12-tetradecatriene-8,10-diyne-1,14-diol (ATR-10)や *Atractylayne* (ATR-11)を含有するが、*A. lancea* はこれらの成分を含有しない傾向があることが確認された。
- 白朮の基原種である *A. japonica* は中国では関蒼朮と称し、蒼朮として扱われることもあるが、上記蒼朮基原種の根茎の 3 次元 HPLC パターンとは異なるパターンを示すため、*A. japonica* を蒼朮として扱うのは問題があると考えた。また、白朮のもう一種類の基原種である *A. macrocephala* の根茎の 3 次元 HPLC パターンは、*A. japonica* のパターンとも異なるため、*A. japonica* と *A. macrocephala* を白朮という一種類の生薬として扱うことの正当性に関しては、今後の薬理研究等の再検討が必要と考える。
- 蒼朮の基原種に関しては、これまで *A. lancea* と *A. chinensis* が認められていたが、本研究の結果、これら 2 種の種間雑種も少なからず存在することが初めて確認された。中国植物誌では *A. lancea* と *A. chinensis* の間に両者を明瞭に区別する形質が認められないとして、*A. chinensis* を *A. lancea* のシノニム(同種異名)として扱っている。ただし、本研究の結果、*A. lancea* と *A. chinensis* は明らかな遺伝的差異を有しており、これらは別種として扱うことを提案する。
- また、中国植物誌にて *A. lancea* と *A. chinensis* の間に明瞭な区別点が認められないとされる理由としては、今回初めて確認された少なからず存在する *A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種が、これら 2 種の形態学および成分差異を埋めてしまったからであると推測された。その証拠として、調査した蒼朮サンプルから ITS 領域の塩基配列より鑑別された *A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種を除くと、*A. lancea* と *A. chinensis* は形態学的な面および成分面にも相違があることが明確となった。
- A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種については、現状では ITS 領域の塩基配列の調査、あるいはこの情報に基づく簡易鑑別法以外の方法、つまり従来行われている形態学的あるいは化学成分的方法による鑑別では、正確な同定が困難と予測される。また、3 次元 HPLC パターンの比較においては、*A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種の根茎の成分組成は *A. chinensis* もしくは *A. lancea* の根茎

の成分組成と類似していた。現在、日本薬局方ではソウジュツの基原植物として、*A. lancea* と *A. chinensis* を収載しているが、*A. lancea* と *A. chinensis* の種間雑種の追加収載を提案する。

8. 本研究の mtDNA の ITS 領域の塩基配列の調査から朮類生薬の基原種における雑種の存在が明確となった。蒼朮基原種においては *A. lancea* と *A. chinensis* (または *A. koreana*) の種間雑種、東北産白朮では *A. chinensis* (または *A. koreana*) と *A. japonica* の種間雑種、佐渡蒼朮においては、*A. lancea* と *A. chinensis* (または *A. koreana*) の種間雑種、さらにこれに *A. japonica* が交配した雑種、*A. lancea* と *A. japonica* の雑種が認められた。
9. ITS 領域の塩基配列中に多くの塩基の重なりを認める ITS ジェノタイプ Type 5 を有するサンプルが、Type 3 (*A. lancea*) と Type 4 (*A. chinensis*) のジェノタイプを有する植物の種間雑種であることと対照的に、多くの塩基の重なりを認める ITS ジェノタイプ Type 1 は現存する他の朮類生薬の基原植物の直接的な交雑によって形成されたジェノタイプではないことが判明した。調査した *A. japonica* 29 サンプルの全てに多くの塩基の重なりを認める原因は不明であるが、*A. japonica* は過去に現存していない種が交雑して形成され、これが安定した種として固定し、現在の *A. japonica* として存在するようになり、ITS 領域は何らかの原因で協調進化をまねがれ、過去の交雑の証拠を残している可能性、すなわち ITS の協調進化を考察する上で興味深い現象を見出した。
10. 朮類生薬の鑑別には種間雑種について考慮する必要があるが、朮類生薬の鑑別には、一般的に片親由来とされる葉緑体 DNA は雑種の検出が困難なので適さないと考える。今回、本研究で採用した核リボソーム DNA の ITS 領域の塩基配列は本研究にて示したように雑種の検出に非常に有効であることが確認され、朮類生薬の鑑別におけるその有効性を認めた。
11. 朮類生薬の基原種は本研究の佐渡蒼朮の解析にて示したように、比較的容易に同属他種と交雑することが予測される。よって、朮類生薬を栽培する場合には、ITS 領域の塩基配列に基づく栽培種の確認および他種からの隔離に注意すべきである。

【Ⅲ】遺伝子情報を応用した生薬鑑別の有用性および問題点

遺伝子情報を応用した生薬の鑑別は、特に近縁な基原種の鑑別に関しては、形態学的特徴や成分組成を指標とした鑑別よりも客観的なデータを得ることができ、明確な鑑別結果が得られた。特に、従来の形態学的な特徴や成分を指標とした鑑別法では明確にできなかった雑種の鑑別は、遺伝子情報を応用すると明確な結果が得られた。また、遺伝子情報による生薬鑑別は、基本的には塩基配列を決定するだけなので、形態学的手法ほど経験や熟練は必要ではなく、標準作業手順(SOP)さえ確立すれば、鑑別を実施する人の経験や熟練に関係なく、精度の高い生薬の基原種確認が可能となる。生薬は日本薬局方にも収載される医薬品であるので、生薬の基原種確認という根源的な品質保証に関して、だれもが実施可能で、客観的な確認試験法を設定することは非常に意義のあることである。さらに、形態学的な特徴や成分を指標とした鑑別では、必要な試験材料に条件があるが、遺伝子情報を応用した生薬の鑑別では、従来の方法による鑑別では困難である微量な粉末の場合でも、正確に鑑別が可能である。その上、遺伝子情報を応用した生薬鑑別は、生薬の基原種を明確にするだけでなく、さらに、この遺伝子情報を応用した生薬鑑別の結果を生薬学的研究の結果にフィードバックすることが可能であり、これまでの形態学的な特徴や成分を指標とした鑑別方法における鑑別精度を検証できることを確認した。また、その上さらに遺伝子情報を応用した生薬鑑別の結果から、他の鑑別方法を再検討し、鑑別精度を向上させることも可能であった。

遺伝子情報を応用した生薬鑑別の有用性は多く挙げられるが、現段階では問題点も少なくない。遺伝子情報を応用した生薬鑑別をするのに、対象とする種のまとまりを示す必要があり、鑑別しなければならない近縁種との分化の程度に適合する遺伝子多型の検出法が必要となる。遺伝子多型にて種のまとまりが把握可能かは、ひとつの生薬ずつ検証する必要がある。つまり、鑑別対象の生薬と異物である近縁種の関係を考慮し、これらを鑑別するために、適切な遺伝子や遺伝子間領域を選定する必要がある。また、多くのサンプルについて遺伝子多型を調査し、その遺伝的変異を把握して、遺伝子情報による鑑別が可能か慎重に判断することが重要である。遺伝子多型の検出方法がいくつかあるが、最も信頼がおけるのは塩基配列決定だと考える。塩基配列決定は他の方法より、試験結果の再現性が高く、信頼性が高いが、一方、欠点としては、調査する領域が限られることで、遺伝的多型が少ないことである。また、ITS のユニバーサルプライマーを使用すると、対象の植物のみではなく、植物や生薬に菌が共生している場合は、その菌まで増幅してしまうことがあり、また他の植物によるコンタミネーションにも注意を払う必要がある。さらに、ITS 領域の塩基配列を決定する際の問題点として、ITS は 1 個体内に非常に多くのコピーが存在しており、解析が困難な場合がある。現時点での生薬の DNA 鑑別は万能でもなく、

完全でもない。他の手法より鑑別精度が高いだけなのである。また、生薬での DNA 鑑別を前提とする場合、生薬中の多糖類等が混在し、DNA の抽出が困難な場合がある。これを改善するために、DNA の抽出に阻害する成分をカラム等で除去する工夫が必要である。さらに、鑑別対象の生薬は保存条件や期間等にもよるが、生薬の DNA は断片化の程度が進み、PCR 法による DNA 増幅が植物よりも困難な場合がある。このため、これを考慮した解析法も必要となる。また、今後日本薬局方等の公定書における品質確認試験として設定するためには、より簡便かつ安価に実施できる試験法の開発は必要と考えられる。

学位論文審査結果の要旨

生薬の品質評価法としての第一は生薬の鑑別である。正しい基原の生薬を使用しなければ、生薬原料として使用する漢方薬等の伝統薬の薬効や安全性は保証できない。生薬の基原種鑑別は、従来、形態学的特徴や化学成分を指標として行われてきた。しかし、特に、近縁種および雑種基原の生薬の鑑別において、生薬の形態学的特徴や成分組成、または含量は非常に類似し、これらの特徴を指標とした鑑別には限界があり、より客観的な新たな鑑別方法が求められている。

本研究では、別属に由来する生薬の鑑別には、*rbcL* 遺伝子のような分子進化速度の遅い遺伝子が適していると考え、*Ophiopogon* 属と *Liriope* 属に由来するものがある麦門冬の葉緑体 DNA *rbcL* 遺伝子の塩基配列に基づいて、種の同定が可能な植物標本 84 検体および市場品麦門冬 44 検体を用いて検討した結果、これら 2 属由来の生薬の遺伝子鑑別が可能であることを示した。

また、雑種存在の可能性があり、鑑別が困難な朮類生薬については、片親由来の葉緑体 DNA 由来のマーカーではなく、両親由来の核リボソーム DNA、ITS 領域の塩基配列に基づいて蒼朮・白朮を含む朮類生薬の基原植物および近縁植物である *Atractylodes* 属 5 種について調べ、局方収載種 4 種が鑑別可能であることを示すと同時に、野生品由来の *A.lancea* と *A.chinensis* の種間雑種の存在を初めて見出し、植物分類学的に見解の分かれる *A.lancea* と *A.chinensis* を別種にすべきである事を提案した。さらに、本研究で確立した白朮、蒼朮の基原種および種間雑種の鑑別方法の応用として、疑問が残っていた中国東北産の白朮と日本産の佐渡蒼朮の基原について検討し、*A.japonica* と *A.chinensis* の雑種および *A.lancea* と *A.japonica* の雑種等の存在も初め確認した。

以上、本研究は、遺伝子情報を応用した生薬鑑別の有用性に加えて問題点も提示するなど、今後の生薬学や漢方薬学研究に貢献する労作と認め、博士（薬学）を授与するに値する論文であると評価された。